

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893104

研究課題名(和文)疾患iPS細胞を用いたもやもや病分子機構の解明および予防法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of moyamoya disease for prophylaxis

研究代表者

小林 果(Kobayashi, Hatasu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70542091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々のもやもや病の感受性多型としてMysterin (RNF213)遺伝子のp.R4810Kを同定したが、病態に果たす役割は不明である。本研究では、もやもや病疾患iPS細胞を血管内皮細胞(iPSEC)に分化して解析を行い、p.R4810Kを有するもやもや病患者由来のiPSECで血管形成能が低下することを明らかにした。さらに、p.R4810Kが有糸分裂異常を引き起こし、ゲノム不安定性を誘導することを証明した。また、組織特異的Mysterinトランスジェニックマウスを作成し、Mysterin変異体の血管内皮での発現が低酸素によるangiogenesisを抑制することをin vivoで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Moyamoya disease (MMD) is a cerebrovascular disease characterized by occlusive lesions in the circle of Willis. The Mysterin (RNF213) R4810K polymorphism increases susceptibility to MMD. Mysterin R4810K reduced angiogenic activities of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells (iPSECs) from patients with MMD. Overexpression of Mysterin R4810K inhibited angiogenic activity of human umbilical vein endothelial cells, while overexpression of Mysterin wild type (WT) did not. In addition, Mysterin R4810K was demonstrated to induce mitotic abnormalities and increased risk of genomic instability. To confirm the anti-angiogenic effect of Mysterin upregulation in vivo, vascular endothelial cell- or smooth muscle cell-specific Mysterin R4757K (R4810K orthologue) or WT transgenic mice were exposed to hypoxia. Cerebral angiogenesis by hypoxia was suppressed in endothelial cell-specific Mysterin R4757K transgenic mice, while it was not suppressed in other mice.

研究分野：予防医学

キーワード：もやもや病 RNF213 iPS細胞 血管内皮細胞 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

最近我々は脳血管疾患であるもやもや病の感受性遺伝子として *Mysterin* (*RNF213*) 遺伝子を同定し、東アジアの患者が共有する創始者多型 p.R4810K が東アジアのもやもや病多発の原因であることを報告した。現在まで *Mysterin* は E3-ligase 活性と ATPase 活性を併せ持つ非常にユニークなタンパク質であることが示され、血管発生や小胞体関連分解に關与する可能性が示されたが、*Mysterin* がもやもや病の病態に果たす役割はいまだ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、p.R4810K 多型を有する家族性もやもや病患者より樹立した疾患 iPS 細胞を血管内皮細胞 (iPSEC に分化し、*Mysterin* 遺伝子および p.R4810K 多型がもやもや病の分子病態に果たす役割の解明と予防医療のターゲット提示を目的とする。

3. 研究の方法

1) もやもや病患者由来の iPSEC の解析

p.R4810K を有さない健常人 2 名、p.R4810K をヘテロあるいはホモで有する遺伝子キャリアー 1 名およびもやもや病患者 3 名から iPS 細胞を樹立し、iPSEC に分化した後、Tube formation assay により血管形成能を、マイクロアレイ解析により発現プロファイルを解析した。さらに、ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) に *Mysterin* R4810K を強制発現し、血管形成能、細胞増殖能および Securin 発現を検討した。

2) R4810K の細胞周期に対する影響の検討

Mysterin R4810K を強制発現したヒト子宮頸癌細胞 HeLa 細胞を用い、細胞増殖能および live imaging による細胞周期 M 期の評価を行った。また、*Mysterin* と M 期制御に主要な役割を果たす MAD2 (Mitotic arrest deficiency2) について、免疫染色による M 期

の局在および免疫沈降による複合体形成を解析した。さらに *Mysterin* R4810K の ex vivo での影響を評価するために、p.R4810K を有するもやもや病患者由来の線維芽細胞をノコダゾール処理して M 期停止を誘導後、MAD2 局在および核型の解析を行った。また患者由来 iPSECs での M 期の評価を行った。

3) 血管内皮および平滑筋特異的 *Mysterin* R4757K Tg マウスにおける低酸素曝露による脳血管 angiogenesis の評価

野生型あるいは p.R4757K (ヒト p.R4810K に相当) を有するマウス *Mysterin* と CAG プロモーター配列の間に loxP で挟まれた停止配列が存在するベクターを用いて Tg マウスを作成した後、組織特異的 Cre 発現マウスと交配を行い、血管内皮あるいは平滑筋特異的 *Mysterin* Tg マウスを作成した。*Mysterin* R4757K または *Mysterin* 野生型 (WT) を血管内皮特異的に発現する Tg マウス (EC-Mut-Tg および EC-WT-Tg)、*Mysterin* R4757K を血管平滑筋特異的に発現する Tg マウス (SMC-Mut-Tg)、*Mysterin* KO マウス (KO) および野生型マウス (WT) の 5 群のマウスを 3 週齢より 2 週間 8% 酸素下で飼育した後、小動物用 MRI による脳血管画像解析を行った。さらに Glut1 免疫組織化学により大脳皮質の脳毛細血管数を計測し、angiogenesis を評価した。

4. 研究成果

1) もやもや病患者由来の iPSEC における Securin 低下を介した血管形成能低下

もやもや病患者および遺伝子キャリアー由来の iPSEC では血管形成能が低下していることが示された (図 1)。また、もやもや病患者および遺伝子キャリアー由来の iPSEC では健常者と比較して発現プロファイルに顕著な違いを認め、特に細胞分裂に關与する多数の遺伝子群の低下を認めた。*Mysterin* R4810K を強制発現した HUVEC は野生型 *Mysterin* 強

制発現に比べ血管形成能が低下した。興味深いことに血管形成能の低下は siRNA による Mysterin 抑制では引き起こされず、Mysterin R4810K の高発現が細胞機能に影響を与えることが示唆された。また HUVEC における Mysterin R4810K 強制発現は細胞増殖の抑制をもたらした。我々は iPSEC で低下していた細胞分裂関連遺伝子群のうち、細胞の遊走機能に関与し血管形成に重要な役割を果たす Securin に着目した。Mysterin R4810K 強制発現 HUVEC においては Securin が低下していることが明らかになった。また siRNA による Securin 抑制は HUVEC および iPSEC において細胞増殖には影響を与えないが、血管形成を低下させることが示された (文献)。

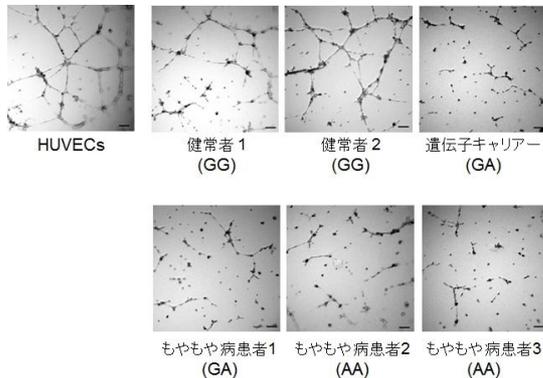


図1 もやもや病特異的 iPSEC における血管形成能の評価。
()内は R4810K の遺伝子型。HUVECs: ヒト臍静脈内皮細胞(陽性対照)。

2) R4810K による有糸分裂異常およびゲノム不安定性

Mysterin R4810K を過剰発現させた HeLa 細胞では、細胞増殖が大きく低下した。また M 期は約 4 倍に延長し、mitotic failure の頻度が上昇していた。こうした形質は siRNA による Mysterin 抑制では認めなかった。Mysterin WT 発現細胞では M 期前中期において、MAD2 が染色体の動原体に存在するという正常な局在を示したのに対し、Mysterin R4810K 発現細胞では MAD2 は動原体には存在せず、Mysterin R4810K と共局在を示した。また、免疫沈降法により Mysterin は MAD2 と複合体を形成すること、さらに、Mysterin

R4810K は WT と比較してより強い複合体形成を示すことが明らかになり、Mysterin R4810K が MAD2 への吸着により正常な局在を阻害することが示唆された。また、ノコタゾール処理した MMD 患者由来線維芽細胞においては、健常者由来細胞と比較して、MAD2 の異常な局在が示された。さらに染色体異数性が有意に増加していることが明らかになり (図 2) R4810K がゲノム不安定性を導くことが示唆された。また患者由来 iPSECs では M 期の延長および mitotic failure の増加が観察され、MMD 患者血管内皮細胞における有糸分裂異常が示された (文献)。

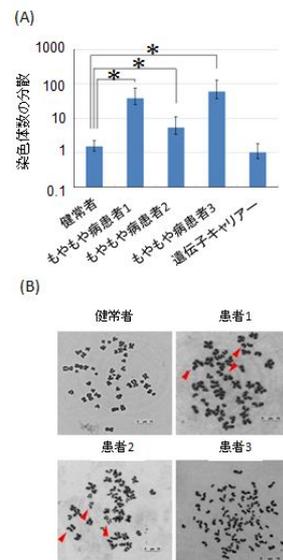


図2 ノコタゾール処理を行ったもやもや病患者由来線維芽細胞の染色体異数性の評価。
(A) 染色体数の分散。* $p < 0.001$ (F検定)。 (B) 代表的な染色体像。正常な形態を示す健常者に対し、患者1、2では姉妹染色体の大きく分離した異常な染色体(矢頭)を認める。患者3ではすべての染色体が異常な分離を示している。

3) 血管内皮特異的 Mysterin R4757K 発現による低酸素下の代償性マウス脳血管 angiogenesis の低下

MRA イメージングの結果、EC-Mut-Tg、EC-WT-Tg、SMC-Mut-Tg、KO、WT のいずれにおいても低酸素曝露による脳血管狭窄、もやもや血管の形成などの異常は認めなかった。低酸素曝露による脳毛細血管数の変化を評価した結果、EC-Mut-Tg 以外のすべてのマウスで低酸素曝露により脳毛細血管が増加したのに対し、EC-Mut-Tg では変化がなかつ

た(図3, 文献)

この結果は、マウスモデルにおいて、*in vitro*での結果と同様に、Mysterin 変異体の血管内皮発現が低酸素による angiogenesis を抑制することを示している。

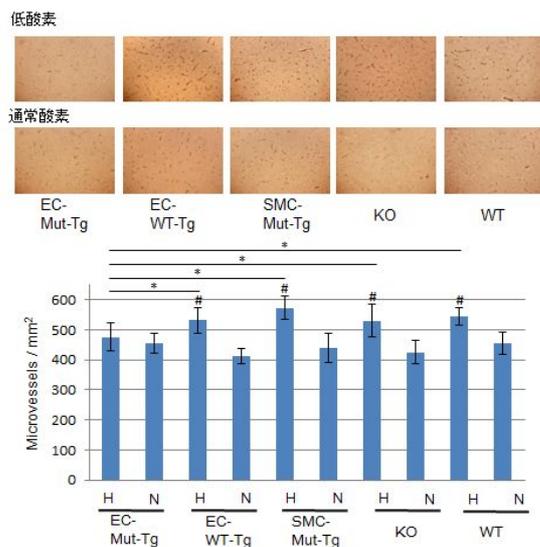


図3 組織特異的Rnf213 Tgマウスにおける低酸素による脳血管angiogenesis。大脳皮質毛細血管のGlut1免疫染色像(上)、毛細血管数の定量化(下)、H:低酸素、N:通常酸素、*P<0.05 vs EC-Mut-Tg低酸素、#P<0.05 vs 通常酸素

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)(以下全て査読あり)

Kobayashi H, Matsuda Y, Hitomi T, Okuda H, Shioia H, Matsuda T, Imai H, Sone M, Taura D, Harada HK, Habu T, Takagi Y, Miyamoto S, Koizumi A, Biochemical and functional characterization of RNF213 (mysterin) R4810K, a susceptibility mutation of moyamoya disease, in angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Journal of the American Heart Association*, in press

Chong PF, Ogata R, Kobayashi H, Koizumi A, Kira R., Early onset of moyamoya syndrome in a Down syndrome patient with the genetic variant RNF213 p.R4810K, *Brain Dev.*, Available online 26 December 2014

DOI: 10.1016/j.braindev.2014.12.006

Hitomi T, Matsuura N, Shigematsu Y, Okano

Y, Shinozaki E, Kawai M, Kobayashi H, Harada KH, Koizumi A., Importance of molecular diagnosis in the accurate diagnosis of systemic carnitine deficiency, *J Genet.*, 94(1): 147-150, 2015

DOI: 10.1007/s12041-015-0486-0

Yan J, Hitomi T, Takenaka K, Kato M, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Koizumi A., Genetic study of intracranial aneurysms, *Stroke*, 46(3):620-626, 2015

DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.007286

小林果, 人見敏明, 小泉昭夫, もやもや病とRNF213 遺伝子, *分子脳血管病*, 13 巻 2 号:54-56, 2014 年

http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=1059

Mineharu Y, Takagi Y, Takahashi JC, Hashikata H, Liu W, Hitomi T, Kobayashi H, Koizumi A, Miyamoto S. Rapid Progression of Unilateral Moyamoya Disease in a Patient with a Family History and an RNF213 Risk Variant *Cerebrovasc Dis.* 36(2): 155-157, 2013

DOI: 10.1159/000352065

Liu W, Senevirathna STMLD, Hitomi T, Kobayashi H, Roder C, Herzig R, Kraemer M, Voormolen HJM, Cahova P, Kriscsek B Koizumi A Genome-wide association study identifies no major founder variant in Caucasian moyamoya disease *J Genet.* 92(3): 605-609, 2013

DOI: 10.1007/s12041-013-0304-5

Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A, The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K induces genomic instability by mitotic abnormality *Biochem Biophys Res*

Commun. 439(4): 419-426, 2013

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.067

Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A, Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya patients *Biochem Biophys Res Commun.* 438(1):13-19, 2013

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.004

〔学会発表〕(計5件)

小林果、(日本衛生学会奨励賞受賞講演) もやもや病および脊髄小脳変性症 36 型の原因遺伝子の同定および機能解析、第 85 回日本衛生学会総会、2015 年 3 月 26-28 日、和歌山市

小林果、奥田裕子、塩井大智、松田佳子、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫、血管内皮特異的 mysterin 変異体 Tg マウスにおける低酸素による脳 angiogenesis 誘導の低下、第 85 回日本衛生学会総会、2015 年 3 月 26-28 日、和歌山市

小林果、奥田裕子、塩井大智、松田佳子、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫、血管平滑筋特異的 mysterin 変異体 Tg マウスにおける低酸素誘導性肺 arteriogenesis の抑制、第 85 回日本衛生学会総会、2015 年 3 月 26-28 日、和歌山市

小林果、人見敏明、土生敏行、原田浩二、小泉昭夫、もやもや病特異的 iPS 細胞由来血管内皮細胞における血管形成能の低下、第 84 回日本衛生学会総会、2014 年 5 月 25-27 日、岡山市

小林果、人見敏明、土生敏行、原田浩二、小泉昭夫、Mysterin 遺伝子の R4810K 多型はもやもや病特異的 iPS 細胞由来血管内皮細胞において Securin の発現抑制を介して血管形成能を低下させる、第 13 回分子予防環境医学研究会、2014 年 1 月 31-2 月 1 日、和歌山市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 果 (KOBAYASHI Hatasu)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号：70542091